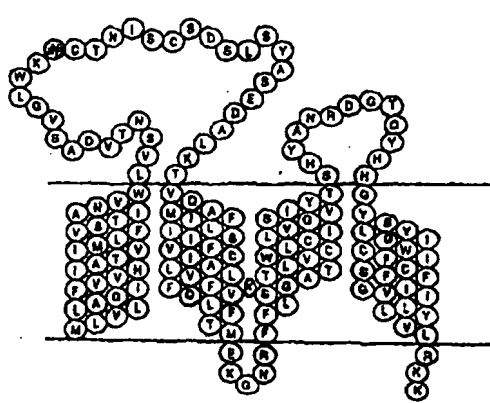


PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/12, C07K 14/705, 16/30, A61K 38/17, G01N 33/50, C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/10065</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. März 1998 (12.03.98)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04785</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 2. September 1997 (02.09.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 96114098.5 3. September 1996 (03.09.96) EP (34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw.</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEIDLE, Ulrich [DE/DE]; Landwehrstrasse 56, D-80336 München (DE). SCHIE-MANN, Sabine [DE/DE]; Rudolf-Diesel-Strasse 11, D-67657 Kaiserslautern (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(54) Title: BREAST CARCINOMA-ASSOCIATED GENE</p>		
<p>(54) Bezeichnung: MAMMAKARZINOM-ASSOZIIERTES GEN</p>		
		
<p>(57) Abstract</p>		
<p>A pharmaceutical composition is disclosed, as well as its use in tumour diagnosis, therapy and prevention, methods for diagnosing, treating and preventing tumours, and antibodies and their use.</p>		
<p>(57) Zusammenfassung</p>		
<p>Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, ihre Verwendung zur Tumordiagnostik, Therapie und Prävention, Verfahren zur Diagnose, Therapie und Prävention von Tumoren, sowie Antikörper und ihre Verwendung.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	IJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

MAMMAKARZINOM-ASSOZIIERTES GEN

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, ihre Verwendung zur Tumordiagnostik, Therapie und Prävention, Verfahren zur Diagnose, Therapie und Prävention von Tumoren, sowie Antikörper und ihre Verwendung.

10

Das unregulierte Wachstum von Tumorzellen wird durch ein neues Muster der Expression von Genen hervorgerufen, welche die Zellzykluskontrolle, Adhäsion, Angiogenese, Invasivität und schließlich die Metastasenbildung steuern (Pardee, Advances in
15 Cancer Res. 65 (1994), 213-227; Ponta et al., Biochem. Biophys. Acta 1198 (1994), 1-10). Der klinische Verlauf von Tumorerkrankungen, wie etwa Brustkrebs, ist durch mehrere definierte molekulare Vorgänge charakterisiert, wie etwa Östrogen-unabhängiges Wachstum, Tamoxifen-Resistenz, Expression von
20 Vimentin, Erhöhung der Invasivität und schließlich Kreuzresistenz gegenüber einer großen Anzahl von chemotherapeutischen Mitteln, die häufig als Multi Drug-Resistenz bezeichnet wird (vgl. z. B. Clarke et al., J. Endocrinol. 122 (1989), 331-340; Sommers et al., Cancer Res. 53 (1992), 5190-5197; Sommers et
25 al., Cancer Res. 49 (1989), 4258-4263 und Saceda et al., Mol. Endocrinol. 2 (1988), 1157-1162).

Es ist ein zentrales Anliegen der Tumorforschung, Gene zu identifizieren, die am Entstehen und am Fortschreiten von
30 Tumorerkrankungen wesentlich beteiligt sind und auf Basis dieser Gene neue Mittel zur Tumordiagnose, -prävention oder -therapie bereitzustellen.

Die vorliegende Erfindung beschreibt die Identifizierung,
35 Klonierung und Charakterisierung des Gens für ein Polypeptid, das als Progressions-assoziiertes Protein "PAP" bezeichnet wird. Dieses Protein wird in der metastasierenden humanen

- 2 -

Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7_{ADR} exprimiert, während in der nicht metastasierenden Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 keine Expression gefunden wurde. Das PAP-Protein, eine dafür codierende Nucleinsäure sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper sind
5 somit als Mittel zur Diagnostik, Therapie oder Prävention von Tumorerkrankungen, insbesondere von Brustkrebs, geeignet.

Durch die Erfindung wird eine pharmazeutische Zusammensetzung bereitgestellt, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie als
10 aktive Komponente enthält:

- (A) eine Nucleinsäure, die
 - (a) in SEQ ID No. 1 dargestellte Protein-codierende Nucleotidsequenz,
 - (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration
15 des genetischen Codes entsprechende Nucleotidsequenz,
 - (c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Sequenz oder
 - (d) einen mindestens 20 Nucleotide langen Abschnitt, der
20 Sequenzen aus (a), (b) oder/und (c) umfaßt,
- (B) ein Polypeptid oder Peptid, das von einer Nucleinsäure gemäß (A) kodiert ist, oder/und
- (C) einen Antikörper gegen ein Polypeptid oder Peptid gemäß (B).

25

Unter stringenten Hybridisierungsbedingungen ist in diesem Zusammenhang zu verstehen, daß eine Hybridisierung auch nach Waschen bei 55°C, vorzugsweise bei 62°C, besonders bevorzugt bei 68°C in einem Nudrigsalsz-Puffer (z.B. 0,2 x SSC, 0,1%
30 SCS) noch auftritt (siehe auch Sambrock et al., (1989), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die pharmazeu-
35 tische Zusammensetzung weiterhin pharmazeutisch übliche Träger-, Hilfs- oder Zusatzstoffe.

- 3 -

Die in SEQ ID No.1 dargestellte Protein-codierende Nucleotidsequenz codiert für ein Protein mit einer Länge von 157 Aminosäuren, welche der von Ruegg et al., 1996 (B4B, a Novel Growth-Arrest Gene, Is Expressed by a Subset of Progenitor/Pre-B Lymphocytes Negative for Cytoplasmic μ -Chain, Am. Ass. Imm., 1996, S. 72-80) beschriebenen B4B-Nucleotidsequenz entspricht und eine Homologie zu bereits bekannten Proteinen aufweist. In den von Ruegg et al. (supra) durchgeführten Versuchen soll die Expression des B4B-Proteins einen Wachstumsarrest in Cos-7-Zellen bewirken. Deshalb wird die Verwendung des B4B-Proteins als potentieller Tumorsuppressor postuliert.

Eines dieser Proteine ist das Kaninchen-Protein CL-20, das während der Differenzierung von Kaninchentrachealzellen in vitro induziert wird und am häufigsten in Plattenepithelgeweben vorkommt (Marvin, J. Biol. Chem. 270 (1995), 28910-28916). Die Expression von CL-20 ist nicht von den Wachstumsbedingungen abhängig, aber Retinoide, welche die Plattenepitheldifferenzierung inhibieren, reprimieren die Induktion von CL-20.

Ein weiteres, zu PAP homologes Protein ist das Ratten-Epithelialmembranprotein EMP-1, welches hauptsächlich in den Proliferations- und Differenzierungszonen der äußeren Magendrüse sowie in Epithelzellen der Magenregion vorkommt (Taylor et al., J. Biol. Chem. 270 (1995), 28824-28833).

Außerdem ist PAP homolog zum peripheren Myelinprotein PMP22 aus Mensch, Maus und Ratte, bei dem es sich um ein Myelinassoziiertes transmembranes Strukturprotein handelt. PMP22 ist ein für die Wachstumshemmung spezifisches Protein, das die Zellzyklus-Progression verhindert (Hayasaka et al., BBRC 186 (1992), 827-831; Edomi et al., Gene 126 (1993), 289-290; Welcher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 7195-7198; Spreyer et al., EMBO J. 10 (1991), 3661-3668).

- 4 -

Aufgrund der Daten von Ruegg et al. und der Homologie zu dem für das Aufrechterhalten des zellulären Ruhezustands verantwortlichen PMP22-Protein war es im höchsten Ausmaß überraschend, daß das PAP-Protein selektiv in der stark entarteten metastasierenden Zelllinie MCF-7_{ADR}, aber nicht in der weniger entarteten Zelllinie MCF-7 exprimiert wird.

Ferner weist PAP eine hohe Homologie zu bisher noch nicht publizierten Proteinen auf, deren Sequenzen in der Genbank gespeichert sind. Diese Proteine werden als murines TMP bzw. humanes TMP bezeichnet und haben eine Aminosäure-Identität von 76 % bzw. 95 % zu PAP.

Die Nucleotid- und Aminosäuresequenzen von murinem TMP sind in SEQ ID No.3 und 4 und von humanem TMP in SEQ ID No.5 und 6 dargestellt. Die Unterschiede zwischen PAP und humanem TMP liegen insbesondere im Bereich der Aminosäuren 32-48.

Weiterhin ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Vektors, der mindestens eine Kopie einer Nucleinsäure wie zuvor definiert oder einen Abschnitt davon enthält zur Transformation einer Zelle. Diese Nucleinsäure kann z. B. genomische DNA, cDNA oder mRNA sein. Vorzugsweise handelt es sich um ein rekombinantes DNA-Molekül.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines Vektors, der einen mindestens 20 Nucleotide langen Abschnitt der in SEQ ID No.1 dargestellten Protein-codierenden Sequenz enthält. Vorzugsweise besitzt dieser Abschnitt eine für PAP-spezifische Nucleotidsequenz. Diese Nucleinsäuren eignen sich insbesondere zur Herstellung von therapeutisch einsetzbaren Antisense-Nucleinsäuren, die vorzugsweise bis zu 50 Nucleotide lang sind.

Der die Nucleinsäure enthaltende Vektor kann in Eukaryonten oder Prokaryonten replizierbar sein. Er kann ein in das Genom der Wirtszelle integrierbarer Vektor, z. B. Bakteriophage λ , oder ein Vektor sein, der extrachromosomal vorliegt (z. B. ein

Plasmid). Der erfindungsgemäße Vektor kann durch Subklonierung der PAP-DNA in einen Basisvektor erhalten werden. Derartige Basisvektoren, insbesondere Vektoren mit den zur Proteinexpression erforderlichen Elementen sind einem Fachmann geläufig.
5 fig.

Bei Klonierung einer für PAP-codierenden Nucleinsäure kann ein Expressionsvektor hergestellt werden, der in einer geeigneten Wirtszelle zur Expression gebracht wird, wobei das erfindungsgemäße Protein entsteht. Bevorzugte Wirtszellen sind
10 Mikroorganismen, wie E.coli oder Hefe, aber auch höhere Zellen, z. B. Säuger- oder Insektenzellen. Bevorzugte Expressionsvektoren sind z. B. Plasmide, Bakteriophage λ für Prokaryonten, Hefevektoren oder virale Vektoren für höhere
15 Zellen, z. B. SV40, Vaccinia, Baculovirus. Bezüglich der Expression einer PAP-codierten Nucleinsäure soll insbesondere auf die bei Sambrook et al. (supra) genannten Methoden verwiesen werden.

- 20 Zur Expression von PAP geeignete Systeme enthalten geeignete Vektoren, z. B. den Vektor pcDNA1 (Invitrogen), bei dem die zu exprimierende DNA sich unter Kontrolle des Cytomegalovirus-promotors befindet.
- 25 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie mit einer Nucleinsäure transformiert ist, die
- (a) die in SEQ ID No. 1 dargestellte Protein kodierende Nucleotidsequenz,
 - 30 (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nucleotidsequenz oder
 - (c) eine Nucleotidsequenz, die eine Homologie von mehr als 95% zu einer Sequenz aus (a) oder/und (b) umfaßt, mit der Maßgabe, daß die Zelle keine Cos-7-Zelle ist.

35

Die Zelle kann sowohl eine eukaryontische als auch eine prokaryontische Zelle sein. Verfahren zur Transformation von

- 6 -

Zellen mit Nucleinsäuren sind allgemeiner Stand der Technik und brauchen daher nicht näher erläutert werden.

Ebenfalls ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die
5 Verwendung eines PAP-Polypeptids, mit der in SEQ ID No. 2 dargestellten Aminosäuresequenz, Fragmenten dieses Polypeptids oder Varianten davon als Immunogen zur Herstellung von Antikörpern.

10 Unter Varianten sind Sequenzen zu verstehen, die sich durch Substitution, Deletion oder/und Insertion einzelner Aminosäuren oder kurzer Aminosäureabschnitte von der in SEQ ID No. 2 dargestellten Aminosäuresequenz unterscheiden.

15 Unter den Begriff "Variante" fallen sowohl natürlich vorkommende allelische Variationen von PAP sowie durch rekombinante DNA-Technologie (insbesondere durch in vitro-Mutagenese mit Hilfe von chemisch-synthetisierten Oligonucleotiden) erzeugte Proteine, die hinsichtlich ihrer biologischen oder/und immuno-
20 logischen Aktivität dem in SEQ ID No.2 dargestellten Protein im wesentlichen entsprechen.

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung eine Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung zur Tu-
25 mordiagnostik, besonders bevorzugt zur Diagnostik von Mammakarzinomen. Besonders bevorzugt ist weiter eine Verwendung als Tumorprogressionsmarker, dessen Expression mit dem Fortschreiten des Tumors oder/und mit dem Metastasierungsgrad korreliert.

30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform zur Diagnose von Tumoren korreliert die Expressionsstärke des PAP-Proteins mit dem Tumorstadium, insbesondere mit der Neigung zur Metastasenbildung.

35 Eine bevorzugte Ausführungsform ist die Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung zur Tumorthherapie oder -prävention,

- 7 -

besonders bevorzugt ist die Verwendung zur therapeutischen oder präventiven Behandlung von Mammakarzinomen.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist
5 ein Verfahren zur Diagnose von Tumoren, wobei man einen Patienten oder ein aus einem Patienten stammendes Gewebe mit einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung in Kontakt bringt und die Expression des PAP-Proteins qualitativ oder/und quantitativ bestimmt. Diese Bestimmung kann beispielsweise
10 spielsweise auf Nucleinsäureebene durch Verwendung von Nucleinsäure-Hybridisierungs sonden oder über reverse Transkription/PCR bzw. auf Proteinebene durch Antikörper nach cyto- oder histochemischen Methoden erfolgen. Besonders bevorzugt ist die Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung als
15 Tumorprogressionsmarker zur Identifizierung der Aggressivität von Tumoren, insbesondere Mammakarzinomen, durch Quantifizierung der PAP-Expression, beispielsweise nach einem operativen Eingriff oder zur Verlaufskontrolle bei einer chemotherapeutischen Behandlung.

20 Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Therapie oder Prävention von Tumoren, wobei man einem Patienten eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung verabreicht, welche die aktive Komponente in einer
25 Anti-Tumor-wirksamen Menge erhält. Spezifische Beispiele für pharmazeutische Zusammensetzungen, welche für therapeutische Zwecke geeignet sind, sind beispielsweise bispezifische Antikörper und Antikörper-Toxin oder Antikörper-Enzymkonjugate, wie sie etwa in klinischen Untersuchungen zum HER2-Gen verwendet wurden (vgl. hierzu Weiner et al. Cancer Res. 55
30 (1995), 4586-4593; Weiner et al., J. Hematotherapy 4 (1995), 453-456, Repp et al., J. Hematotherapy 4 (1995), 415-421; Valone, J. Hematotherapy 4 (1995), 471-475; Rodrigues, Cancer Res. 55 (1995), 63-70).

35 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Therapie von Tumoren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- 8 -

die Expression des PAP-Proteins in den Tumorzellen reduziert oder ausschaltet.

Eine Reduktion der Expression kann durch die Anwendung von
5 Mitteln oder Verfahren erreicht werden, die in die Transkription oder/und die Translation eingreifen oder die Halbwertszeit der mRNA verringern.

Beispielsweise können anti-sense Oligonucleotide zu der in SEQ
10 ID No. 1 dargestellten Nucleotidsequenz in die Zellen eingebracht werden oder die Zelle wird mit einem Expressionsvektor, der eine anti-sense Sequenz zu SEQ ID No. 1 exprimiert, transformiert. Ferner können mit der PAP mRNA-Expression oder der PAP-Translation interferierende Faktoren verwendet werden.

15 Durch Verwendung eines sog. Targeting-Vektors für das PAP-Gen und Durchführung einer homologen Rekombination, kann die PAP-Expression vollständig ausgeschaltet werden. Die genannten Verfahren sind dem Fachmann bekannt und bedürfen deshalb
20 ner weiteren Erläuterung.

Für verschiedene Zwecke kann es andererseits nötig sein, die Proliferation von Zellen zu steigern, wenn beispielsweise bestimmte Zellpopulationen oder -subpopulationen in großen
25 Mengen benötigt werden, oder in einem Gewebe bestimmte Zellen gezielt zur Proliferation angeregt werden sollen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Steigerung der Proliferation einer Zelle, das dadurch
30 gekennzeichnet ist, daß man

- (A) ein Polypeptid oder Peptid in der Zelle zur Expression bringt oder seine Expression in der Zelle erhöht, das durch
 - (a) eine in SEQ ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz,
 - 35 (b) eine Nucleotidsequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nucleotidsequenz,

- 9 -

- (c) eine Nucleotidsequenz, die eine Homologie von mehr als 95% zu einer Nucleotidsequenz aus (a) oder/und (b) oder
- (d) einen mindestens 20 Nucleotide langen Abschnitt der Sequenzen aus (a), (b) oder/und (c) umfaßt, kodiert wird, oder
- (B) ein Polypeptid oder Peptid, das von einer Nucleinsäure gemäß (A) kodiert ist, in die Zelle einbringt.

10 Neben Nucleinsäuren und Polypeptiden von PAP sind auch Antikörper gegen Polypeptide oder Fragmente davon als Bestandteile der pharmazeutischen Zusammensetzung geeignet.

Besonders bevorzugt sind polyklonale Antikörper gegen ein wie
15 oben beschriebenes Polypeptid, mit der Maßgabe, daß der Antikörper nicht gegen die Peptidsequenz CSDSLSYASEDALK oder CSHY-ANRDGTOQYHH gerichtet ist oder ein monoklonaler Antikörper gegen ein Polypeptid wie oben beschrieben. Am meisten bevorzugt ist ein Antikörper, der dadurch gekennzeichnet ist, daß
20 er gegen eine Peptidsequenz gerichtet ist, die den Aminosäuren 32 bis 48, 49 bis 62 oder 119 bis 129 der in SEQ ID No. 2 dargestellten Aminosäuresequenz entspricht.

Die Herstellung von Antikörpern kann dabei auf übliche Weise
25 durch Immunisierung von Versuchstieren mit dem vollständigen PAP-Protein oder Fragmenten davon und anschließende Gewinnung der resultierenden polyklonalen Antiseren erfolgen. Nach der Methode von Köhler und Milstein oder deren Weiterentwicklungen können aus den Antikörper-produzierenden Zellen der Versuchstiere auf bekannte Weise durch Zellfusion monoklonale Antikörper erhalten werden. Ebenso können nach bekannten Methoden humane monoklonale Antikörper hergestellt werden.

Als Immunogen bevorzugt sind Peptide, die aus den extrazellulären Domänen von PAP (vgl. Fig. 2) stammen. Besonders bevorzugte Peptide stammen aus Bereichen, die den Aminosäuren 32-48, 49-62 oder 119-129 von SEQ ID No.2 entsprechen. Diese

- 10 -

Peptide werden vorzugsweise nach bekannten Methoden an einen Träger, z. B. Keyhole Limpet Hemocyanin nach bekannten Methoden (Snipes et al., J. Cell. Biol. 117 (1992), 225-238) gekoppelt. Die resultierenden Konjugate werden zur Immunisierung von Versuchstieren, z. B. Kaninchen, verwendet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Antikörper gegen das PAP-Protein oder eine Variante davon, vorzugsweise ein Antikörper, der keine Kreuzreaktion mit homologen Proteinen wie EMP-1, PMP22 und CL-20 zeigt. Besonders bevorzugt ist der Antikörper gegen eine Peptidsequenz gerichtet, die den Aminosäuren 32 bis 48, 49 bis 62 oder 119 bis 129 der in SEQ ID No.2 dargestellten Aminosäuresequenz entspricht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der oben beschriebenen Antikörper in einem immunologischen Verfahren einer Immunpräzipitation, eines Western-Blots, eines kompetitiven Immuntests oder eines Sandwichtests.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung eines Polypeptids oder eines Fragments davon, das kodiert wird durch

- (a) die in SEQ ID No. 1 dargestellte Protein kodierende Nucleotidsequenz,
- (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nucleotidsequenz oder
- (c) eine Nucleotidsequenz, die eine Homologie von mehr als 95% zu einer Sequenz aus (a) oder/und (b) umfaßt, zur Herstellung eines Antikörpers unter Verwendung einer Phage-Display-Antikörperbibliothek.

Mit diesem Verfahren wird die Identifizierung und Herstellung eines Antikörpers gegen das PAP-Protein ausschließlich mit Methoden der rekombinanten DNA-Technologie ohne die Verwendung von Tieren oder aus Tieren gewonnenen (primären) Zellen möglich.

- 11 -

Die bei einer "klassischen" Antikörperherstellung nötigen arbeits- und zeitaufwendigen Schritte wie Immunisierung von Versuchstieren, Boosten oder Zellfusion und Selektionszyklen von Einzelklonen entfallen somit.

5

Die Bereitstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß der Erfindung, des PAP-Proteins, einer dafür codierenden Nucleinsäure und eines dagegen gerichteten Antikörpers schafft die Voraussetzung für eine gezielte Suche nach Effektoren
10 dieses Proteins. Angriffspunkt für diese Substanzen sollten die potentiellen extrazellulären Domänen des Proteins sein, die sich im Bereich der Aminosäurereste 29 bis 63 und 118 bis 130 der in SEQ ID No. 2 dargestellten Aminosäuresequenz befinden. Stoffe, die über diese Region des Proteins inhibitorisch
15 oder aktivierend wirken, sind in der Lage, durch PAP gesteuerte Zellfunktionen selektiv zu beeinflussen. Daher können sie bei der Therapie entsprechender Krankheitsbilder eingesetzt werden. Bei Krankheitsbildern, die auf einen Ausfall von PAP zurückzuführen sind, könnte eine gentherapeutische Behandlung
20 erfolgen, welche die Übertragung einer für PAP codierenden Nucleinsäure mittels Vektoren, z. B. viralen Vektoren, in das entsprechende Zielgewebe umfaßt. Andererseits kann bei Krankheitsbildern, die auf eine unkontrollierte Expression von PAP zurückzuführen sind, eine gentherapeutische Behandlung erfolgen,
25 gen, welche zu einer Blockierung dieser Expression führt.

Die vorgestellten Ergebnisse schaffen überdies die Voraussetzung für eine gezielte Diagnostik von Krankheiten, die mit Veränderungen der PAP-Aktivität ursächlich verbunden sind.
30 Diese Untersuchungen können mit Hilfe spezifischer Nucleinsäuresonden zum Nachweis auf Nucleinsäureebene, d.h. auf Gen- bzw. Transkripte-ebene oder mit Hilfe von Antikörpern gegen PAP zum Nachweis auf Proteinebene durchgeführt werden.

35 Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele, Abbildungen und Sequenzprotokolle näher erläutert. Es zeigen:

- 12 -

- Abb. 1 einen Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen humanem PAP (1), humanem (2) und Maus (3) TMP, Ratten EMP-1 (4), Kaninchen CL-20 (5), humanem (6), Maus (7) und Ratten (8) PMP 22,
- 5 Abb. 2 eine Vorhersage der Topologie von PAP in einer Lipiddoppelschicht. Der gefüllte Kreis bedeutet eine potentielle N-Glykosilierungsstelle,
- SEQ ID No.1 eine Nucleinsäuresequenz, welche die für PAP-codierende genetische Information enthält,
- 10 SEQ ID No.2 die Aminosäuresequenz von PAP,
- SEQ ID No.3 die Nucleinsäuresequenz von Maus TMP cDNA,
- SEQ ID No.4 die Aminosäuresequenz von Maus TMP,
- SEQ ID No.5 die Nucleinsäuresequenz von humaner TMP cDNA und
- 15 SEQ ID No.6 die Aminosäuresequenz von humanem TMP.

Beispiele

Beispiel 1

20

Kultivierung von Zelllinien

Die Zelllinien MCF-7 und MCF-7_{ADR} sind humane Mammakarzinom-Zelllinien (Thompson et al., J. Cell. Physiol. 150 (1992), 534-
25 544 und Fairchild et al., Cancer Res. 47 (1987), 5141-5148.

Die Zelllinie MCF-7 ist nicht-metastasierend, exprimiert den Östrogen-Rezeptor, zeigt Östrogen-abhängiges Wachstum in der Nacktmaus und keine Expression von Vimentin. Die Zelllinie
30 MCF-7_{ADR} leitet sich von MCF-7 ab und wurde über ihre Resistenz gegen Adriamycin selektiert. Sie ist metastasierend, zeigt eine Multi Drug-Resistenz, keine Expression des Östrogen-Rezeptors sowie Östrogen-unabhängiges Wachstum in der Nacktmaus.

35 Die Kultivierung dieser Zelllinien erfolgte in Improved Minimal Essential Medium (IMEM; Gibco, Grand Island, NY) mit 5 % föta-

lem Rinderserum (Gibco). Die Zellen wurden bei 37 °C und einer 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Beispiel 2

5

Differential-Display PCR

Die Differential-Display-Polymerase-Kettenreaktion (DD-PCR) wurde nach bekannten Methoden (vgl. Liang und Pardee, Science
10 275 (1992), 967-970; Liang et al., Cancer Res. 52 (1992), 6966-6968 und Liang et al., Nucleic Acids Res. 21 (1993), 3269-3275) unter Verwendung des RNA-map-Kits (GenHunter Corp., Brookline, MA) gemäß den Vorschriften des Herstellers durchgeführt.

15

Aus MCF-7 und MCF-7_{ADR}-Zellen wurde Gesamt-RNA nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Anal. Biochem. 162 (1987), 156-159) unter Verwendung des Total-RNA Isolation System (Promega Corp., Madison, WI) isoliert. Die Beseitigung von DNA-Kontami-
20 nationen aus den RNA-Proben erfolgte durch Inkubation mit RNase freier DNase I unter Verwendung des Message-Clean-Kit (GenHunter Corp., Brookline, MA) durch Inkubation für 30 min bei 37 °C.

25 DNA-freie Gesamt-RNA (0,2 µg) aus MCF-7 und MCF-7_{ADR}-Zellen wurde als Matrize für die cDNA-Erststrangsynthese in Gegenwart von 10 µM der Ankerprimer T₁₂MG, T₁₂MC, T₁₂MA und T₁₂MT (wobei M dreifach degeneriert für G, A und C ist), 1 X Reverse Transkriptase-Puffer (125 mM Tris-Cl, pH 8,3; 188 mM KCl; 7,5 mM
30 MgCl₂; 25 mM Dithiothreitol) und 250 µM dNTP-Mischung verwendet. Die Lösung wurde 5 min. auf 65 °C erhitzt, für 10 min auf 37 °C abgekühlt und dann wurden 200 U Moloney murine Leukemia-virus (MMLV) Reverse Transkriptase zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch 5-minütige
35 Inkubation bei 95 °C gestoppt.

- 14 -

Die PCR wurde in einer Reaktionslösung durchgeführt, die 0,1 Volumina des Ansatzes zur Reversen Transkription, 10 μ M des jeweiligen T₁₂MN-Ankerprimer, 2 μ M 10-mer Primer mit willkürlich festgelegter Sequenz, 1 x-PCR-Puffer (100 mM Tris-Cl, pH 8,4; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0,01 % Gelatine), 25 μ M dNTP, 10 μ Ci [α -³⁵S] dATP und 10 U Amplitaq DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Norwalk, CT) enthielt. Die PCR wurde für insgesamt 40 Zyklen bei 94 °C für 30 s, 40 °C für 2 min, 72 °C für 30 s und schließlich 5 min bei 72 °C durchgeführt.

10

Nach Zugabe von Beladungspuffer zu jeweils 3,5 μ l Probe wurden die PCR-Produkte 2 min lang bei 80 °C erhitzt und dann auf ein denaturierendes 5 % Polyacrylamid-Sequenziergel zur Elektrophorese aufgetragen. Das getrocknete Gel wurde autoradio-graphisch auf differentiell exprimierte Gene analysiert.

Die in zwei unabhängigen DD-PCR-Reaktionen identifizierten Banden, die differentiell exprimierten Genen entsprechen, wurden aus dem getrockneten Gel ausgeschnitten. Die cDNA wurde aus dem Gel durch Einweichen des Gelstücks in 100 μ l H₂O für 10 min und anschließendes Kochen für 15 min eluiert. Die cDNA wurde durch Ethanolfällung in Gegenwart von 3 M Natriumacetat und 50 μ g Glycogen als Träger isoliert und in 10 μ l H₂O aufgenommen. 4 μ l der eluierten cDNA wurden in einer zweiten PCR reamplifiziert. Dabei wurden dieselben 5'- und 3'-Primer und die oben beschriebenen Bedingungen verwendet, außer daß dNTP-Konzentrationen von 20 μ M verwendet wurden und das Reaktionsgemisch keine Radioisotopen enthielt.

Die auf diese Weise erhaltenen amplifizierten PCR-Fragmente wurden über ein 1,5 % Agarosegel aufgetrennt, gereinigt und als Sonden für die Northern-Analyse von RNA aus MCF-7 und MCF-7_{ADR} verwendet.

35

Beispiel 3

Northern Analyse

5 PolyA⁺RNA wurde aus Gesamt-RNA unter Verwendung des PolyA T-tractIII mRNA-Isolierungssystem (Promega Corp., Madison, WI) isoliert. Parallele Spuren von PolyA⁺ RNA aus MCF-7 und MCF-7_{ADR}-Zellen (1 µg von jeder Zelllinie) wurden auf einem denaturierenden 1%-Agarose-Formaldehyd-Gel nach Größe aufgetrennt
10 und dann auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) durch Kapillarblotting in 20 x SSC überführt. Nach UV-Quervernetzung (Stratagene UV-Stratalinker 1800) wurden die Membranen mit [α-³²P]dCTP-markierten DD-PCR-Produkten hybridisiert, die mit der "random-primed" DNA-Markierungsmethode hergestellt und bis zu einer spezifischen
15 Aktivität von 2 x 10⁸ dpm/µg unter Verwendung des Rediprime DNA-Markierungssystems (Amersham, Braunschweig) markiert worden waren. Die Vorhybridisierung (5 h) und Hybridisierung (über Nacht) mit radioaktiven Sonden erfolgte in 50% Formamid,
20 5% SSC, 5 x Denhardt-Lösung, 1% SDS und 100 µg/ml denaturierter Lachssperma-DNA bei 42°C. Die Membranen wurden mit 1 x SSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur für 15 min. 2 x gewaschen, gefolgt von Waschen mit 0,25 x SSC, 0,1% SDS bei 55 - 60°C für 15 bis
25 30 min. Dann wurden die Membranen autoradiographisch untersucht.

Diejenigen DD-PCR-Produkte, bei denen eine differentielle mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte, wurden durch das TA-Cloningsystem (Invitrogen, San Diego, CA) in den PCR II-
30 Vektor subkloniert. Die subklonierten Fragmente wurden unter Verwendung des Quiagen-Plasmidkits (Quiagen, Hilden) isoliert und erneut als Sonden für die Northern Analyse zur Verifizierung der differentiellen mRNA-Expression verwendet.

- 16 -

Beispiel 4

Charakterisierung von DD-PCR-Fragmenten, die differentiell exprimierten mRNAs entsprechen

5

Die subklonierten Fragmente, welche sich von differentiell exprimierten mRNAs ableiten, wurden im TA-Klonierungsvektor unter Verwendung des Dye-Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems GmbH, Foster City, CA) sequenziert. Die Nukleotidsequenzdaten wurden auf Homologie mit bekannten Genen in den Datenbanken Genbank und EMBL unter Verwendung des Computerprogramms BLAST analysiert.

Auf diese Weise konnten neben 10 bekannten mRNA-Spezies eine neue mRNA identifiziert werden, die in der Zelllinie MCF-7_{ADR} differentiell exprimiert wird.

Um die vollständige cDNA dieser neuen mRNA zu erhalten, wurde ein 556 bp langes subkloniertes DD-PCR-Fragment als Sonde zur Musterung einer humanen Herz cDNA-Bank (Clontech, Palo Alto, CA) verwendet, die in einem Lambda gt10-Vektor hergestellt worden war. Auf diese Weise wurde ein etwa 2 kb cDNA-Klon isoliert, von dem beide Stränge sequenziert und mit dem klonierten DD-PCR-Fragment verglichen wurden.

25

Zur Identifizierung der 5'-Region der cDNA wurde eine RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) PCR nach der von Frohmann (PCR-Meth. Appl. 4 (1994), 40-58) und Schaefer (Anal. Biochem. 227 (1995), 255-273) beschriebenen Methode mit den Modifikationen von Kato et al. (Gene 150 (1994), 243-250) durchgeführt. Das auf diese Weise erhaltene 1 kb lange 5' RACE PCR-Produkt wurde sequenziert und mit dem aus der Musterung der cDNA-Bank erhaltenen cDNA Klon verglichen.

Die resultierende Nukleotidsequenz der vollständigen cDNA wurde mit bekannten DNA-Sequenzen aus der Genbank und der EMBL-Datenbank verglichen.

- 17 -

Wie durch Northern Blot-Analyse festgestellt, wird die neu identifizierte mRNA ausschließlich in der Zelllinie MCF-7_{ADR} exprimiert. Daher wurden die cDNA und das dafür codierende Protein als "Progressions-assoziiertes Protein" (PAP) bezeichnet. Die Nucleotid- und Aminosäuresequenzen von PAP sind in SEQ ID No.1 und 2 angegeben. Die Nucleotidsequenz umfaßt 2786 nt mit einem offenen Leserahmen von 471 nt (157 Aminosäuren), der mit einem ATG-Initiationscodon bei Position 219 beginnt und mit einem TAA-Stopcodon an Position 692 endet. Ein potentielles N-Glycosilierungssignal im Bereich der Aminosäuren 43-45 wurde mit Aminosäure 43 als möglichem Akzeptor der Zuckergruppe identifiziert. Eine potentielle Acylierungsstelle durch kovalente Addition von Myristat wurde an Aminosäureposition 39 identifiziert. Eine mögliche Phosphorylierungsstelle für die Serin-Threonin-Kinase Caseinkinase II wurde an Position 48 identifiziert.

Die PAP cDNA ist Mitglied einer Genfamilie. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von Mitgliedern dieser Genfamilie ist in Fig. 1 dargestellt. Die höchste Ähnlichkeit hat das humane PAP zum Kaninchen-Protein CL-20 und zum Ratten-Protein EMP-1 (Identität 77 bzw. 76 %) gefolgt vom Protein PMP-22 aus Mensch, Maus und Ratte (Identität von 41 %, 43 % und 41 %).

Weiterhin wurde festgestellt, daß PAP eine große Ähnlichkeit mit bislang nicht publizierten Proteinen hat, die als murines Tumor-assoziiertes Membranprotein (Maus TMP, Genbank U25633, SEQ ID NO. 3/4) und humanes Tumor-assoziiertes Membranprotein, Genbank U43916, SEQ ID NO. 5/6) bezeichnet werden. Murines TMP hat eine Länge von 160 Aminosäuren, wobei 39 Aminosäuren unterschiedlich zu PAP sind (Identität 76%). Humanes TMP hat eine Länge von 157 Aminosäuren, wobei 7 Aminosäuren unterschiedlich zu PAP sind (Identität 95%).

Basierend auf computerunterstützte Hydrophobizitätsplots und Vorhersagen der Sekundärstruktur kann ein Modell für die hypothetische Topologie von PAP vorgeschlagen werden (Fig. 2).

- 18 -

Demzufolge enthält PAP 4 hydrophobe potentielle Transmembrandomänen und 2 potentielle extrazelluläre Domänen (Aminosäuren 29-63 bzw. 118-130).

- 5 Im Bereich der ersten extrazellulären Domäne, insbesondere im Bereich der Aminosäuren 32-48, liegen die größten Unterschiede von PAP zu humanem TMP (5 Aminosäuren).

Beispiel 5

10

Expressionsmuster von PAP

- Um die gewebespezifische Expression von PAP zu untersuchen, wurde die Verteilung von PAP-mRNA in verschiedenen humanen
15 Geweben durch Northern Blot-Analyse unter Verwendung von Multiple Tissue Northern Blots (Clontech, Palo Alto, CA) untersucht.

- Dabei wurde festgestellt, daß PAP-mRNA in den meisten humanen
20 Geweben exprimiert wird. PAP-mRNA fehlt jedoch in peripheren Blutleukozyten und wird nur sehr schwach im Gehirn exprimiert. Weiterhin fehlte PAP-mRNA in verschiedenen Leukämie- und Lymphom-Zelllinien wie etwa HL 60 (Promyeelozytäre Leukämie), K562 (chronische myeloische Leukämie), Molt-4 (lympho-blastoide
25 Leukämie), Raji (Burkitt's Lymphom) und HeLa (Zervikal-Karzinom). Eine starke Expression von PAP-mRNA wurde jedoch in SW480-Zellen (Kolorektales Adenokarzinom) und in G361-Melanomzellen festgestellt.

30 Beispiel 6

Herstellung eines PAP-Expressionskonstrukts und transiente Expression in COS-Zellen

- 35 Die PAP-cDNA wurde in die EcoRV-Stelle des Expressionsvektors pcDNA1 (Invitrogen, San Diego, CA) stromabwärts vom Cytomegalovirus-Promotor subkloniert. Der Stammvektor ohne cDNA-Inser-

- 19 -

tion wurde als negative Kontrolle verwendet. Rekombinante DNA wurde über eine Quiagensäule (Quiagen, Hilton, DE) gereinigt und durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm quantifiziert.

- 5 COS-Zellen, die in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum exponentiell wuchsen, wurden mit Trypsin behandelt, mit Phosphat-gepufferter Salzlösung gewaschen und bei 800 g zentrifugiert. $1,5 \times 10^6$ -Zellen wurden in 200 μ l Phosphat-gepufferter Salzlösung mit 5 μ g Vektor DNA resuspendiert. Die Zellen wurden
10 5 min auf Eis gekühlt, in eine Elektro-porationsküvette (Biorad, Herkules, CA) mit einem Spalt von 4 mm überführt und bei 300 V und 125 Mikrofaraad einer Elektroporation unterzogen.

Die transfizierten Zellen wurden für 5 min auf Eis gekühlt und
15 auf sieben 35 mm Kulturschalen mit 2 ml DMEM und 10 % fötalem Kälberserum aufgeteilt und für 48 h kultiviert. Dann wurden die Zellen mit Tris-gepufferter Salzlösung gewaschen, in DMEM mit 2 % Paraformaldehyd für 30 min fixiert, mit Tris-gepufferter Salzlösung gewaschen und 30 min in Tris-gepufferter Salz-
20 lösung mit 0,1 % Saponin permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden 30 min bei Raumtemperatur in Tris-gepufferter Salzlösung, 2 % Rinderserumalbumin, 1 % Schweinehautgelatine (Typ A Sigma), 2 % Ziegenserum und 0,1 % Saponin blockiert. Die Zellen wurden mit Anti-PAP-Antikörpern (Beispiel
25 7), 1 : 500 in Blockierungspuffer mit 0,02 % Saponin verdünnt, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurde Fluoresceinisothiocyanat-markiertes Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobulin, 1 : 200 in Blockierungspuffer mit 0,02 % Saponin verdünnt, zugegeben. Nach Waschen mit Tris-gepufferter Salzlösung wurden die Zellen
30 auf Objektträger aufgebracht und die Immunreaktivität durch konfokale Mikroskopie mit einem Biorad MRC-600-Scanner zusammen mit einem Zeiss Axiophot Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Als negative Kontrolle wurde Präimmunserum (1 : 500) als primäres Antiserum verwendet.

Beispiel 7

Antikörperherstellung

- 5 Anti-Peptid-Antikörper wurden gegen synthetische Peptide aus den ersten und zweiten extrazellulären Loops von PAP hergestellt:

Peptid 1: Cys⁴⁹-Ser-Asp-Ser-Leu-Ser-Tyr-Ala-Ser-Glu-Asp-Ala-
10 Leu-Lys⁶²-COOH

Peptid 2: His¹¹⁹-Tyr-Ala-Asn-Arg-Asp-Gly-Thr-Gln-Tyr-His¹²⁹-COOH

Die Peptide wurden an Keyhole-Limpet-Hemocyanin nach bekannten Methoden (Snipes et al., (1992), Supra) gekoppelt. Die Kon-
15 jugate wurden zur Immunisierung von Kaninchen mit komplettem Freund'schem Adjuvans verwendet. Anschließend folgte eine Auffrischung der Immunisierung in zweiwöchigen Intervallen für insgesamt 4 mal mit 500 µg Peptid und inkomplettem Freund'schem Adjuvans. Von den immunisierten Tieren wurde Blut
20 entnommen und das Serum isoliert. Die Aktivität des Immunserums wurde durch Festphasen-ELISA (Beispiel 6) getestet.

- 21 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE: Sandhofer Strasse
- (C) ORT: Mannheim-Waldhof
- 10 (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 68305

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neues Mammakarzinom-asso
ziiertes Gen

15

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- 20 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
(EPA)

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2786 Basenpaare
- 30 (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

35

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- 22 -

(B) CLON(E): Human PAP

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

5

(B) LAGE:219..689

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

10	AGCACTCTCC AGCCTCTCAC CGCAAATTA CACACCCCAG TACACCAGCA GAGGAACTT	60
	ATAACCTCGG GAGGCGGGTC CTTCCCCTCA GTGCGGTCAC ATACTTCCAG AAGAGCGGAC	120
	CAGGGCTGCT GCCAGCACCT GCCACTCAGA GCGCCTCTGT CGCTGGGACC CTTCAGAACT	180
15	CTCTTTGCTC ACAAGTTACC AAAAAAAAAA GAGCCAAC ATG TTG GTA TTG CTG	233
	Met Leu Val Leu Leu	
	1 5	
20	GCT GGT ATC TTT GTG GTC CAC ATC GCT ACT GTT ATT ATG CTA TTT GTT	281
	Ala Gly Ile Phe Val Val His Ile Ala Thr Val Ile Met Leu Phe Val	
	10 15 20	
	AGC ACC ATT GCC AAT GTC TGG TTG GTT TCC AAT ACG GTA GAT GCA TCA	329
25	Ser Thr Ile Ala Asn Val Trp Leu Val Ser Asn Thr Val Asp Ala Ser	
	25 30 35	
	GTA GGT CTT TGG AAA AAC TGT ACC AAC ATT AGC TGC AGT GAC AGC CTG	377
	Val Gly Leu Trp Lys Asn Cys Thr Asn Ile Ser Cys Ser Asp Ser Leu	
30	40 45 50	
	TCA TAT GCC AGT GAA GAT GCC CTC AAG ACA GTG CAG GCC TTC ATG ATT	425
	Ser Tyr Ala Ser Glu Asp Ala Leu Lys Thr Val Gln Ala Phe Met Ile	
	55 60 65	
35	CTC TCT ATC ATC TTC TGT GTC ATT GCC CTC CTG GTC TTC GTG TTC CAG	473
	Leu Ser Ile Ile Phe Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Phe Val Phe Gln	
	70 75 80 85	
40	CTC TTC ACC ATG GAG AAG GGA AAC CGG TTC TTC CTC TCA GGG GCC ACC	521
	Leu Phe Thr Met Glu Lys Gly Asn Arg Phe Phe Leu Ser Gly Ala Thr	
	90 95 100	

- 23 -

	ACA CTG GTG TGC TGG CTG TGC ATT CTT GTG GGG GTG TCC ATC TAC ACT	569
	Thr Leu Val Cys Trp Leu Cys Ile Leu Val Gly Val Ser Ile Tyr Thr	
	105 110 115	
5	AGT CAT TAT GCG AAT CGT GAT GGA ACG CAG TAT CAC CAC GGC TAT TCC	617
	Ser His Tyr Ala Asn Arg Asp Gly Thr Gln Tyr His His Gly Tyr Ser	
	120 125 130	
	TAC ATC CTG GGC TGG ATC TGC TTC TGC TTC AGC TTC ATC ATC GGC GTT	665
10	Tyr Ile Leu Gly Trp Ile Cys Phe Cys Phe Ser Phe Ile Ile Gly Val	
	135 140 145	
	CTC TAT CTG GTC CTG AGA AAG AAA TAAGGCCGGA CGAGTTCATG GGGATCTGGG	719
	Leu Tyr Leu Val Leu Arg Lys Lys	
15	150 155	
	GGGTGGGGAG GAGGAAGCCG TTGAATCTGG GAGGGAAGTG GAGGTTGCTG TACAGGAAAA	779
	ACCGAGATAG GGGAGGGGGG AGGGGGAAGC AAAGGGGGGA GGTCAAATCC CAAACCATT	839
20	CTGAGGGGAT TCTCTACTGC CAAGCCCCTG CCCTGGGGAG AAAGTAGTTG GCTAGTACTT	899
	TGATGCTCCC TTGATGGGGT CCAGAGAGCC TCCCTGCAGC CACCAGACTT GGCCTCCAGC	959
25	TGTTCTTAGT GACACACACT GTCTGGGGCC CCATCAGCTG CCACAACACC AGCCCCACTT	1019
	CTGGGTCATG CACTGAGGTC CACAGACCTA CTGCACTGAG TTAAATAGC GGTACAAGTT	1079
	CTGGCAAGAG CAGATACTGT CTTTGTGCTG AATACGCTAA GCCTGGAAGC CATCCTGCCC	1139
30	TTCTGACCCA AAGCAAAACA TCACATTCCA GTCTGAAGTG CCTACTGGGG GGCTTTGGCC	1199
	TGTGAGCCAT TGTCCCTCTT TGGAACAGAT ATTTAGCTCT GTGGAATTCA GTGACAAAAT	1259
35	GGGAGGAGGA AAGAGAGTTT GTAAGGTCAT GCTGGTGGGT TAGCTAAACC AAGAAGGAGA	1319
	CCTTTTCACA ATGGAAGACC TGGGGGATGG TCAGAGCCCA GTCGAGACCT CACACACGGC	1379
	TGTCCCTCAT GGAGACCTCA TGCCATGGTC TTTGCTAGGC CTCTTGCTGA AAGCCAAGGC	1439
40	AGCTCTTCTG GAGTTTCTCT AAAGTCACTA GTGAACAATT CGGTGGTAAA AGTACCACAC	1499
	AAACTATGGG ATCCAAGGGG CAGTCTTGCA ACAGTGCCAT GTTAGGGTTA TGTTTTTAGG	1559
45	ATCCCCCTCA ATGCAGTCAG TGTTTCTTTT AAGTATACAA CAGGAGAGAG ATGGACATGG	1619

- 24 -

CTCATTGTAG CACAATCCTA TTACTCTTCC TCTAACATTT TTGAGGAAGT TTTGTCTAAT 1679

TATCAATATT GAGGATCAGG GCTCCTAGGC TCAGTGGTAG CTCTGGCTTA GACACCACCT 1739

5 GGAGTGATCA CCTCTTGGGG ACCCTGCCTA TCCCACTTCA CAGGTGAGGC ATGGCAATTC 1799

TGGAAGCTGA TTA AACACA CATAAACCAA AACCAAACAA CAGGCCCTTG GGTGAAAGGT 1859

GCTATATAAT TGTGAAGTAT TAAGCCTACC GTATTTTCAGC CATGATAAGA ACAGAGTGCC 1919

10 TGCATTCCCA GGAAATACG AAAATCCCAT GAGATAAATA AAAATATAGG TGATGGGCAG 1979

ATCTTTTCTT TAAAATAAAA AAGCAAAAAC TCTTGTGGTA CCTAGTCAGA TGGTAGACGA 2039

15 GCTGTCTGCT GCCGCAGGAG CACCTCTATA CAGGACTTAG AAGTAGTATG TTATTCCTGG 2099

TTAAGCAGGC ATTGCTTTGC CCTGGAGCAG CTATTTTAAG CCATCTCAGA TTCTGTCTAA 2159

AGGGGTTTTT TGGGAAGACG TTTTCTTTAT CGCCCTGAGA AGATCTACCC CAGGGAGAAT 2219

20 CTGAGACATC TTGCCTACTT TTCTTTATTA GCTTTCTCCT CATCCATTTC TTTTATACCT 2279

TTCTTTTTTG GGGAGTTGTT ATGCCATGAT TTTTGGTATT TATGTAAAAG GATTATTACT 2339

25 AATTCTATTT CTCTATGTTT ATTCTAGTTA AGGAAATGTT GAGGGCAAGC CACCAAATTA 2399

CCTAGGCTGA GGTAGAGAG ATTGGCCAGC AAAAAGTG GGAAGATGAA CTTTGTTCATT 2459

ATGATTTTCAT TATCACATGA TTATAGAAGG CTGTCTTAGT GCAAAAACA TACTTACATT 2519

30 TCAGACATAT CCAAAGGGAA TACTCACATT TTGTTAAGAA GTTGAACAT GACTGGAGTA 2579

AACCATGTAT TCCCTTATCT TTTACTTTTT TTCTGTGACA TTTATGTCTC ATGTAATTG 2639

35 CATTACTCTG GTGGATTGTT CTAGTACTGT ATTGGGCTTC TTCGTTAATA GATTATTTCA 2699

TATACTATAA TTGTAAATAT TTTGATACAA ATGTTTATAA CTCTAGGGAT ATAAAAACAG 2759

ATTCTGATTC CCTTCAAAAA AAAAAA 2786

40

- 25 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 157 Aminosäuren

5 (B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

10

Met Leu Val Leu Leu Ala Gly Ile Phe Val Val His Ile Ala Thr Val
 1 5 10 15

Ile Met Leu Phe Val Ser Thr Ile Ala Asn Val Trp Leu Val Ser Asn
 15 20 25 30

Thr Val Asp Ala Ser Val Gly Leu Trp Lys Asn Cys Thr Asn Ile Ser
 35 40 45

20 Cys Ser Asp Ser Leu Ser Tyr Ala Ser Glu Asp Ala Leu Lys Thr Val
 50 55 60

Gln Ala Phe Met Ile Leu Ser Ile Ile Phe Cys Val Ile Ala Leu Leu
 65 70 75 80

25

Val Phe Val Phe Gln Leu Phe Thr Met Glu Lys Gly Asn Arg Phe Phe
 85 90 95

Leu Ser Gly Ala Thr Thr Leu Val Cys Trp Leu Cys Ile Leu Val Gly
 30 100 105 110

Val Ser Ile Tyr Thr Ser His Tyr Ala Asn Arg Asp Gly Thr Gln Tyr
 115 120 125

35 His His Gly Tyr Ser Tyr Ile Leu Gly Trp Ile Cys Phe Cys Phe Ser
 130 135 140

Phe Ile Ile Gly Val Leu Tyr Leu Val Leu Arg Lys Lys
 145 150 155

40

- 26 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 2614 Basenpaare

5 (B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: beides

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON(E): Maus TMP

15 (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 90..569

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GACCAGCAGA CTGCTCTACC ACCCAGGGCA TCTGCCTCTC TCACTGGATA CTCCAGAATT 60

CTCTACTCAG AAGTCACCAA AAAGCCAAG ATG TTG GTG CTA CTG GCT GGT CTC 113

25 Met Leu Val Leu Leu Ala Gly Leu
160 165

TTT GTG GTC CAC ATT GCC ACT GCC ATT ATG CTG TTT GTC TCC ACC ATT 161

30 Phe Val Val His Ile Ala Thr Ala Ile Met Leu Phe Val Ser Thr Ile
170 175 180

GCC AAC GTC TGG ATG CTT GCA GAT TAC GCA AAT GCA TCT GTA GGG CTT 209

Ala Asn Val Trp Met Val Ala Asp Tyr Ala Asn Ala Ser Val Gly Leu
185 190 195

35

TGG AAG AAC TGC ACT GGT GGT AAC TGC GAC GGC TCC CTG TCC TAC GGC 257

Trp Lys Asn Cys Thr Gly Gly Asn Cys Asp Gly Ser Leu Ser Tyr Gly
200 205 210

40

- 27 -

	AAT GAA GAT GCT ATC AAG GTA GTG CAA GCC TTC ATG ATC CTC TCC ATC	305
	Asn Glu Asp Ala Ile Lys Val Val Gln Ala Phe Met Ile Leu Ser Ile	
	215 220 225	
5	ATC TTC TCC ATC ATC TCC CTC GTG GTC TTC GTG TTC CAG CTC TTC ACT	353
	Ile Phe Ser Ile Ile Ser Leu Val Val Phe Val Phe Gln Leu Phe Thr	
	230 235 240 245	
	ATG GAG AAG GGA AAC CGG TTC TTC CTC TCG GGG TCC ACC ATG CTG GTG	401
10	Met Glu Lys Gly Asn Arg Phe Phe Leu Ser Gly Ser Thr Met Leu Val	
	250 255 260	
	TGC TGG CTG TGT ATC CTG GTT GGA GTG TCA ATC TAC ACT CAT CAT TAC	449
	Cys Trp Leu Cys Ile Leu Val Gly Val Ser Ile Tyr Thr His His Tyr	
15	265 270 275	
	GCC CAC AGC GAA GGG AAC TTC AAC TCC AGC AGC CAC CAA GGC TAT TGT	497
	Ala His Ser Glu Gly Asn Phe Asn Ser Ser Ser His Gln Gly Tyr Cys	
	280 285 290	
20	TTC ATC CTG ACC TGG ATC TGC TTC TGT TTC AGC TTC ATC ATC GGC ATA	545
	Phe Ile Leu Thr Trp Ile Cys Phe Cys Phe Ser Phe Ile Ile Gly Ile	
	295 300 305	
25	CTC TAT ATG GTC CTG AGG AAG AAA TAAGCCGAAT ACGCTCATGG GCGTCTGGGG	599
	Leu Tyr Met Val Leu Arg Lys Lys	
	310 315	
	GCGGGGTGGG CTGGGTAGGA GGAAGCAACC TAACCTGGGA GGGAAGCAGG AGTCACTGTG	659
30	TAGGAATAAC AGAGAGGGGA GGGGGGTGGG GAGAGGGAAG GAAGAGGGGG AGAGGCCCAA	719
	ACCCAAACCA TATCTGGGGC GGTGGGATTC TCTACTGCCA GGCACCCATC CTTGGAAGAA	779
35	AGTTGTTGGC TGATATGCTG ATGCTTCCTT GACGTCACCA GAGAGTCCTC CTCTAGCCAC	839
	CGAATATGGC TCCGTCCATC CTCAATTACA TACACTCGGG GCCTCCCCAG CTGCCATACC	899
	ACTGGCGCCA CTCTGAGGG TGGCTGCTGG GTCACACACT GAGGTCTTCC ACATCCATAT	959
40	CATCAAGTTC TGATGGTGGT TCAGGTCTTA GCAAGAGCAG ATATTGCCCG ATGCTGAGGC	1019
	TAAGTCTGGA AGCCACTTTG TCCTTGTGAC CTAAAACCAA ACATCAAATC CAGATCCCAT	1079
45	GTGCCTGTAG TGGGAGCTTT GGCCAGGAAG CCAATGTGCA TATTTGGGTG GCCTTTCTAA	1139

- 28 -

	CAAAAGTATA GGATGATGAG AGATGGTTTG TAAGTTCAAG CTGATGGAAT TGGTTTAGCC	1199
	AAGAAATGGA AGTTTCTACC CCAGAGGATC TTGGAGACAG GTGGGGACAG GCAGTGCTCC	1259
5	TCAGTCACGT GTCACCGAGC TGTCCCTCAT GGAGGCCTCC TGTGTGAAC TCTGCTAGAC	1319
	TCTCACTTAC AGCCAAGGCA GCTTTTCTGG AGTTTTTCTA GATTCTCTAG AGCCAAAGAT	1379
	GATAATGCCT CACAAAACAT AGGGTCAAAG CATATGCCCA CCGCAGTGCT ATAGTAAGTT	1439
10	TGTGGGTTTT TAGGATTCCC CCAAAGCACT CAATGTATCT TGTATATGTA ACAGGGGAGA	1499
	AATGCATGTG TTCCTTTGAC ATACAATTCT GAACTAGGAA TATTTGAGGA AGTCCAATGA	1559
15	TGACCAACAA CACTGGGGAC CGATAATATA ACATCTAAAT GCAGTAGTCA CTGTTGCTTT	1619
	GACCTGGGCT GGAGTGGTCT CCTCTCAACA GCTTTCATCA CACTATTTTC CAGCTAAAGA	1679
	TGGCAAAGCT GTAAGCCAAT TAACATATAC ACCAACCTAA ACTAAAGAAC CAGTCCTGAG	1739
20	GGTGTGAGCA AAGGTGCTAT CTGGTTATGG ATTATTAAGC AAACCATATT TCATTTATGT	1799
	TGAGAAGAGA ATGCCTGCCC TCAGGGAAAA AAAATGTAA TTGTGTGAGA TGAATAAAGT	1859
25	CCTGGTGATA GGCAGACAGT TTCTTTTTTA AAACAGGAGA AACTCTTAGG GCATCCAGAC	1919
	AGATGGTAGC TAAATTGTTG GGGCTGCAGG GGTATTCCTG TATAAGACTT AGAGGTAGTA	1979
	TGATATCTCA GATTTCTGCC TTAAAGGGCT TTCTTTTTAG AATAGTTTCT TTTTATTGCC	2039
30	CTTAGAAGAT CATTTTtagg AAGAGTATGA GCTATCTTTT CTACAATTCT TTCCTAGGG	2099
	AATATTCTTA TCCATTTCTT AAATACAATT CTTTGGGAG GGAGTTTTTA TGCTATAGTT	2159
35	GCTGGTATTT ATGTAAAGGG ACCCATTACT AAGTGTATTT CTCTAGCATA TTATGTTTAA	2219
	GGGACTGTTC AAGGTAGGTT ACTGAACTGC CGGGCTGATG TTAGAGACAC TGGCCAGAAA	2279
	AGCTATAATA AGTTCTTAAA TTATAATTG ATCACTATAC ATTTGTTCTA TGCTGCCTTA	2339
40	TGTTcATAAG AATATCAACA GACAGCTAGA GCCAGAAAAA AATAGTCACA TTTTGTTAAA	2399
	AAGTTGAATT ATGACTGGAG TGAACCGTGC ATTCCCTTGC CTTTTACTTT TTTTCTGTGA	2459
45	CATTTACGTC TCATGTAATT TGCATCGCAT TGGTGGGTta TTCTAGTACT GTATTTGGCT	2519

- 29 -

TCTTCATTAA TAGGATATTT CACATACTAT AATTGTAAAT ATTTTGATAC AAATGTTTAT 2579

AACTCTAGGG ATATAAAAAC AAATTCTGAT TCCCT 2614

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 160 Aminosäuren

10 (B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

15

Met Leu Val Leu Leu Ala Gly Leu Phe Val Val His Ile Ala Thr Ala
1 5 10 15

Ile Met Leu Phe Val Ser Thr Ile Ala Asn Val Trp Met Val Ala Asp
20 25 30

Tyr Ala Asn Ala Ser Val Gly Leu Trp Lys Asn Cys Thr Gly Gly Asn
35 40 45

25 Cys Asp Gly Ser Leu Ser Tyr Gly Asn Glu Asp Ala Ile Lys Val Val
50 55 60

Gln Ala Phe Met Ile Leu Ser Ile Ile Phe Ser Ile Ile Ser Leu Val
65 70 75 80

30

Val Phe Val Phe Gln Leu Phe Thr Met Glu Lys Gly Asn Arg Phe Phe
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Thr Met Leu Val Cys Trp Leu Cys Ile Leu Val Gly
35 100 105 110

Val Ser Ile Tyr Thr His His Tyr Ala His Ser Glu Gly Asn Phe Asn
115 120 125

40 Ser Ser Ser His Gln Gly Tyr Cys Phe Ile Leu Thr Trp Ile Cys Phe
130 135 140

- 30 -

Cys Phe Ser Phe Ile Ile Gly Ile Leu Tyr Met Val Leu Arg Lys Lys
145 150 155 160

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 756 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

10 (C) STRANGFORM: beides

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

15

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON(E) : Human TMP

(ix) MERKMAL:

20 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:1..471

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEO ID NO: 5:

25

ATG TTG GTG CTA CTG GCT GGT ATC TAT GTG GTC CAC ATC GCT ACT GTT 48
Met Leu Val Leu Leu Ala Gly Ile Tyr Val Val His Ile Ala Thr Val
165 170 175

30 ATT ATG CTA TTT GTT AGC ACC ATT GCC AAT GTC TGG TTG GTT TCC AGT 96
Ile Met Leu Phe Val Ser Thr Ile Ala Asn Val Trp Leu Val Ser Ser
180 185 190

ACG GCA GAT GCA TCA GTA GGT CTT TGG AAA AAC TGT TCC AAC ATG GAG 144
35 Thr Ala Asp Ala Ser Val Gly Leu Trp Lys Asn Cys Ser Asn Met Glu
195 200 205

TGC AGT GAC AGC CTG TCA TAT GCC AGT GAA GAT GCC CTC AAG ACA GTG 192
Cys Ser Asp Ser Leu Ser Tyr Ala Ser Glu Asp Ala Leu Lys Thr Val
40 210 215 220

- 31 -

CAG GCC TTC ATG ATT CTC TCT ATC ATC TTC TGT GTC ATT GCC CTC CTG 240
 Gln Ala Phe Met Ile Leu Ser Ile Ile Phe Cys Val Ile Ala Leu Leu
 225 230 235 240

5 GTC TTC GCG TTC CAG CTC TTC ACC ATG GAG AAG GGA AAC CGG TTC TTC 288
 Val Phe Ala Phe Gln Leu Phe Thr Met Glu Lys Gly Asn Arg Phe Phe
 245 250 255

CTC TCA GGG GCC ACC ACA CTG GTG TGC TGG CTG TGC ATT CTT GTG GGG 336
 10 Leu Ser Gly Ala Thr Thr Leu Val Cys Trp Leu Cys Ile Leu Val Gly
 260 265 270

GTG TCC ATC TAC ACT AGT CAT TAT GCG AAT CGT GAT GGA ACG CAG TAT 384
 Val Ser Ile Tyr Thr Ser His Tyr Ala Asn Arg Asp Gly Thr Gln Tyr
 15 275 280 285

CAC CAC GGC TAT TCC TAC ATC CTG GGC TGG ATC TGC TTC TGC TTC AGC 432
 His His Gly Tyr Ser Tyr Ile Leu Gly Trp Ile Cys Phe Cys Phe Ser
 290 295 300

20 TTC ATC ATC GGC GTT CTC TAT CTG GTC CTG AGA AAG AAA TAAGGCCGGA 481
 Phe Ile Ile Gly Val Leu Tyr Leu Val Leu Arg Lys Lys
 305 310 315

25 CGAGTTCATG GGGATCTGGG GGGTGGGGAG GAGGAAGCCG TTGAATCTGG GAGGGAAGTG 541

GAGGTTGCTG TACAGGAAAA ACCGAGATAG GGGAGGGGGG AGGGGGAAGC AAAGGGGGGA 601

GGTCAAATCC CAAACCATTA CTGAGGGGAT TCTCTACTGC CAAGCCCCTG CCCTGGGGAG 661
 30 AAAGTAGTTG GCTAGTACTT TGATGCTCCC TTGATGGGGT CCAGAGAGCC TCCCTGCAGC 721

CACCAGACTT GGCCTCCAGC TGTCTTAGT GACAC 756

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 157 Aminosäuren

40

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

- 32 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Leu Val Leu Leu Ala Gly Ile Tyr Val Val His Ile Ala Thr Val
 1 5 10 15
 5 Ile Met Leu Phe Val Ser Thr Ile Ala Asn Val Trp Leu Val Ser Ser
 20 25 30
 Thr Ala Asp Ala Ser Val Gly Leu Trp Lys Asn Cys Ser Asn Met Glu
 10 35 40 45
 Cys Ser Asp Ser Leu Ser Tyr Ala Ser Glu Asp Ala Leu Lys Thr Val
 50 55 60
 15 Gln Ala Phe Met Ile Leu Ser Ile Ile Phe Cys Val Ile Ala Leu Leu
 65 70 75 80
 Val Phe Ala Phe Gln Leu Phe Thr Met Glu Lys Gly Asn Arg Phe Phe
 85 90 95
 20 Leu Ser Gly Ala Thr Thr Leu Val Cys Trp Leu Cys Ile Leu Val Gly
 100 105 110
 Val Ser Ile Tyr Thr Ser His Tyr Ala Asn Arg Asp Gly Thr Gln Tyr
 25 115 120 125
 His His Gly Tyr Ser Tyr Ile Leu Gly Trp Ile Cys Phe Cys Phe Ser
 130 135 140
 30 Phe Ile Ile Gly Val Leu Tyr Leu Val Leu Arg Lys Lys
 145 150 155

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung,
5 dadurch gekennzeichnet,
daß sie als aktive Komponente enthält:
(A) eine Nucleinsäure, die
 - (a) in SEQ ID No. 1 dargestellte Protein-
codierende Nucleotidsequenz,
 - 10 (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degene-
ration des genetischen Codes entsprechende Nu-
cleotidsequenz,
 - (c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b)
unter stringenten Bedingungen hybridisierende
15 Sequenz oder
 - (d) einen mindestens 20 Nucleotide langen
Abschnitt der Sequenzen aus (a), (b) oder/und
(c) umfaßt,
 - (B) ein Polypeptid oder Peptid, das von einer Nuclein-
20 säure gemäß (A) codiert ist, oder/und
 - (C) einen Antikörper gegen ein Polypeptid oder Peptid
gemäß (B).
-
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1,
25 dadurch gekennzeichnet,
daß sie weiterhin pharmazeutisch übliche Träger-, Hilfs-
oder/und Zusatzstoffe enthält.
-
3. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2
30 zur Tumordiagnostik.
-
4. Verwendung nach Anspruch 3 zur Diagnostik von
Mammakarzinomen.
-
- 35 5. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2
zur Herstellung eines Mittels für die Tumordiagnostik.

- 34 -

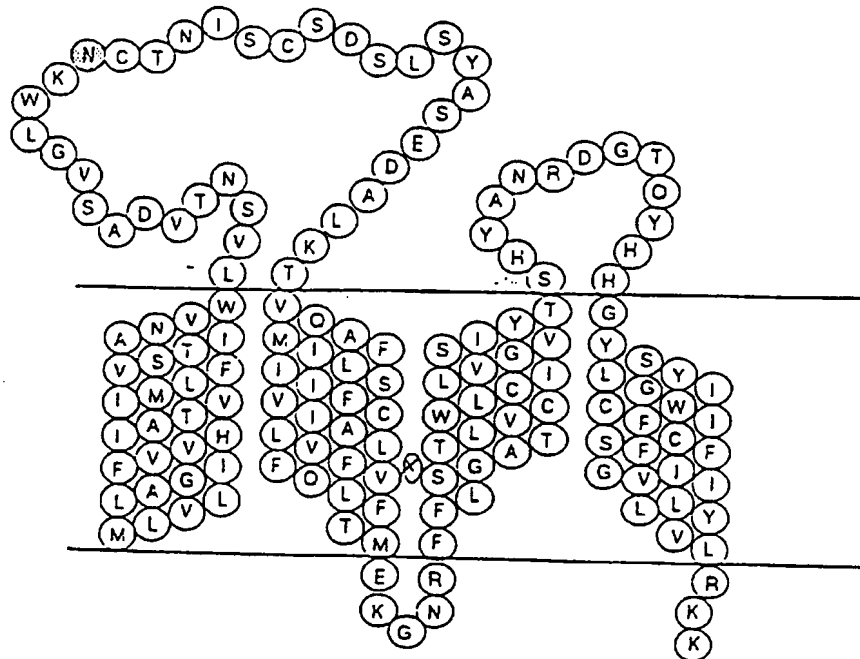
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 bis 5 als Tumorprogressionsmarker.
7. Verfahren zur Diagnose von Tumoren,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen Patienten oder ein aus dem Patienten stammendes Gewebe mit einer Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2 in Kontakt bringt und die Expression des PAP-Proteins qualitativ oder/und quantitativ bestimmt.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Expressionsstärke des PAP-Proteins mit dem Tumorstadium, insbesondere der Metastasenbildung in Geweben korreliert.
9. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2 zur Tumorthherapie oder -prävention.
10. Verwendung nach Anspruch 9 zur therapeutischen oder präventiven Behandlung von Mammakarzinomen.
11. Verfahren zur Therapie oder Prävention von Tumoren,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einem Patienten eine Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2 verabreicht, die die aktive Komponente in einer Anti-Tumor-wirksamen Menge enthält.
12. Verfahren zur Therapie von Tumoren,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Expression des PAP-Proteins in den Tumorzellen verringert oder ausschaltet.

13. Verfahren zur Steigerung der Proliferation einer Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß man
- (A) ein Polypeptid oder Peptid in der Zelle zur Expression bringt oder seine Expression in der Zelle erhöht, das durch
- (a) eine in SEQ ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz,
- (b) eine Nucleotidsequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nucleotidsequenz,
- (c) eine Nucleotidsequenz, die eine Homologie von mehr als 95 % zu einer Nucleotidsequenz aus (a) oder/und (b) oder
- (d) einen mindestens 20 Nucleotide langen Abschnitt der Sequenzen aus (a), (b) oder/und (c) umfaßt, kodiert wird, oder
- (B) ein Polypeptid oder Peptid, das von einer Nucleinsäure gemäß (A) kodiert ist in die Zelle einbringt.
14. Verwendung eines Polypeptids gemäß SEQ ID No. 2 oder von Muteinen oder Fragmenten dieses Polypeptids als Immunogen zur Herstellung von Antikörpern.
15. Polyklonaler Antikörper gegen ein Polypeptid nach Anspruch 14, mit der Maßgabe, daß er nicht gegen die Peptidsequenz CSDSLSYASEDALK oder CSHYANRDGTOQYHH gerichtet ist.
16. Monoklonaler Antikörper gegen ein Polypeptid nach Anspruch 14.
17. Antikörper nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen eine Peptidsequenz gerichtet ist, die den Aminosäuren 32-48, 49-62 oder 119-129 der in SEQ ID No. 2 dargestellten Aminosäuresequenz entspricht.

- 36 -

18. Antikörper nach einem der Ansprüche 15 bis 17 zur Verwendung in einem immunologischen Verfahren einer Immunpräzipitation, eines Western Blots, eines kompetitiven Immuntests oder eines Sandwich-Tests.
- 5
19. Verwendung eines Polypeptids oder eines Fragments davon, das kodiert wird durch
- (a) die in SEQ ID No. 1 dargestellte Protein codierende Nucleotidsequenz,
 - 10 (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nucleotidsequenz oder
 - (c) eine Nucleotidsequenz, die eine Homologie von mehr als 95% zu einer Sequenz aus (a) oder/und (b) um-
 - 15 faßt, zur Herstellung eines Antikörpers unter Verwendung einer Phage-Display-Antikörperbibliothek.
20. Zelle,
- dadurch gekennzeichnet,**
- 20 daß sie mit einer Nucleinsäure transformiert ist, die
- (a) die in SEQ ID No. 1 dargestellte Protein codierende Nucleotidsequenz,
 - (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende
 - 25 Nucleotidsequenz oder
 - (c) eine Nucleotidsequenz, die eine Homologie von mehr als 95% zu einer Sequenz aus (a) oder/und (b) um-
 - faßt, mit der Maßgabe, daß die Zelle keine Cos-7-Zelle ist.

30



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/EP 97/04785

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/30 A61K38/17 G01N33/50
C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N A61K G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARVIN KW ET AL: "Identification and characterization of a novel squamous cell-associated gene related to PMP22" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 48, 1 December 1995, MD US, pages 28910-28916, XP000616413 cited in the application see page 28911, left-hand column; figure 2 ---	1,2, 14-16,18
X	RUEGG CL ET AL.: "B4B, a novel growth-arrest gene, is expressed by a subset of progenitor/pre-B lymphocytes negative for cytoplasmic mu-chain" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 157, no. 1, 1 July 1996, BALTIMORE US, pages 72-80, XP000616417 see page 73; figure 2 ---	1,2, 13-16, 18,20
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 December 1997

Date of mailing of the international search report

07.01.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/04785

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>SCHIEMANN, SABINE ET AL: "Differential gene expression in human mammary carcinoma cells: identification of a new member of a receptor family"</p> <p>ANTICANCER RES., 1997, 17, 13-20, XP002049575</p> <p>see figure 2</p>	<p>1,2,13, 20</p>
P,X	<p style="text-align: center;">---</p> <p>WO 97 19171 A (AMGEN INC) 29 May 1997</p> <p>see page 4 - page 5; figure 3; example 4</p> <p>see page 31</p> <p>see page 39 - page 41</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1,2, 14-16, 18,20</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 97/04785

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Note: although the claims 3, 4, 6-8 refer to diagnostic procedures to be applied to the human/animal body, the search was made based on the given effects of the compound concerned.

Although the claims 9-12, 14, 19 refer to diagnostic procedures to be applied to the human/animal body, the search was made based on the given effects of the compound concerned.

information on patent family members

PCT/EP 97/04785

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04785

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/30 A61K38/17 G01N33/50 C12Q1/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C07K C12N A61K G01N C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MARVIN KW ET AL: "Identification and characterization of a novel squamous cell-associated gene related to PMP22" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 270, Nr. 48, 1.Dezember 1995, MD US, Seiten 28910-28916, XP000616413 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 28911, linke Spalte; Abbildung 2 --- -/--	1,2, 14-16,18
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 9. Dezember 1997		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 07.01.98
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Espen, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04785

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	RUEGG CL ET AL.: "B4B, a novel growth-arrest gene, is expressed by a subset of progenitor/pre-B lymphocytes negative for cytoplasmic mu-chain" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 157, Nr. 1, 1.Juli 1996, BALTIMORE US, Seiten 72-80, XP000616417 siehe Seite 73; Abbildung 2 ---	1,2, 13-16, 18,20
P,X	SCHIAMANN, SABINE ET AL: "Differential gene expression in human mammary carcinoma cells: identification of a new member of a receptor family" ANTICANCER RES., 1997, 17, 13-20, XP002049575 siehe Abbildung 2 ---	1,2,13, 20
P,X	WO 97 19171 A (AMGEN INC) 29.Mai 1997 siehe Seite 4 - Seite 5; Abbildung 3; Beispiel 4 siehe Seite 31 siehe Seite 39 - Seite 41 -----	1,2, 14-16, 18,20

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefodert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 97/04785

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung : Obwohl die Ansprüche 3,4,6-8 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Obwohl die

Ansprüche 9-12,14,19 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

INTERNATIONALER RECHTENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter	1ales Aktenzeichen
-------	--------------------

PCT/EP 97/04785

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9719171 A	29-05-97	AU 1082197 A	11-06-97
